

## セレンウム欠乏食及び充足食を投与したマウス赤血球の加齢に伴う グルタチオンペルオキシダーゼ活性と酸化タンパク質レベルの挙動

何 普 明・安 本 教 傳  
(京都大学食糧科学研究所\*)

### Age-Associated Changes in Glutathione Peroxidase Activity and Oxidized Protein Level in the Erythrocyte from Mice Fed Selenium-Deficient and -Adequate Diets

Puming HE and Kyoden YASUMOTO  
*Research Institute for Food Science, Kyoto University*

Erythrocytes from mice fed selenium-deficient (Se(-)) and selenium-adequate (Se(+)) diets were separated into 4 fractions of different cell density by density-gradient centrifugation. Glutathione peroxidase (GSHPx) activities from Se(-) group were significantly lower than those in the same density fractions from Se(+) group. Superoxide dismutase activity and catalase activity showed no significant change between the same density fractions or between the whole erythrocytes of these 2 experimental groups. The oxidized protein levels increased significantly in most fractions from Se(-) group compared with the corresponding fractions from Se(+) group. The results were interpreted as indicating that the deterioration in cellular antioxidative mechanisms, especially the decrease in the GSHPx activities, was attributable to the observed increase in oxidized protein level in Se(-) group. The acceleration of erythrocytes aging appeared to be in part associated with a defect in cellular antioxidant defense mechanisms.

セレンウム (Se) は、実験動物及びヒトにとって必須微量栄養素である。Se は、セレノシステインとしてグルタチオンペルオキシダーゼ (GSHPx) の反応中心を構成し、生体内の過酸化水素をはじめとする種々の過酸化物を除去して、酸化的障害から細胞を防御するのに役立っている。

著者らは先に市販飼料で飼育した老化促進モデルマウス赤血球において、その細胞齢が赤血球細胞内の GSHPx を含む抗酸化力と密接な関係にあることを明らかにした<sup>1)</sup>。本研究では、トルラ酵母を基本とした Se 欠乏及び充足飼料を用いて飼育したマウスの Se 栄養状態が赤血球細胞齢にもたらす影響を調べた。

---

\*所在地：京都府宇治市五ヶ庄 (〒611)

## 実験方法

### 1) 飼料組成及び動物

京都大学胸部疾患研究所竹田教授から分与を受け、自家繁殖させた老化促進モデルマウス (SAM-R/1, 正常老化型, 4 週齢) にトルラ酵母を基本とした Se 欠乏飼料 (Se (-) 食, 35.7%トルラ酵母, 0.3% DL-メチオニン, 44%蔗糖, 13%大豆油, 4%塩混合, 1%ビタミン混合, 2%セルロース), 及びそれに Se として 0.1ppm 含有されるように亜セレン酸ナトリウムを添加した Se 充足飼料 (Se (+) 食) を 1 年間投与した後実験に用いた。

### 2) 実験材料及び分析

マウスは実験食終了後断頭により全血を採取した。血漿を遠心除去した血球画分をセルロースカラムに通して、白血球及び血小板を除いた<sup>2)</sup>。集めた赤血球画分をパーコールの密度勾配を利用して遠心分離した<sup>3)</sup>。密度の重い方から 4 等分に分取し、それぞれ画分 1, 2, 3, 4 とした。分取した各画分に生理食塩水を加えてパーコール及びアンギオグラフィンを除去した後、プロテアーゼインヒビターを含む緩衝溶液 (pH 7.4) に懸濁し (カタラーゼについては、この時点で分析に用いた)、赤血球を超音波破碎して分析に供した。

ヘモグロビンは市販キットを用いて、シアンメトヘモグロビン法によって分析した。GSHPx 活性は Paglia らの方法<sup>4)</sup> に準じて、 $\alpha$ -ブチルヒドロペルオキシドを基質とし、グルタチオンの酸化反応とグルタチオン還元酵素による NADPH の酸化反応をカップルさせて測定した。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性は McCord らの方法<sup>5)</sup> で測定した。キサンチンオキダーゼにより発生した  $O_2^-$  が、SOD によって  $O_2$  と  $H_2O_2$  を生ずる不均化反応及び酸化型チトクロム c と反応して還元型チトクロム c を生ずる反応の間の拮抗作用を利用して、生成する還元型チトクロム c を測定することにより SOD 活性を求めた。カタラーゼ活性は Aebi らの方法<sup>6)</sup> によって測定した。酸化タンパク質含量は、2, 4-ジニトロフェニールヒドラジン (DNPH) の取り込み量をもって評価した<sup>7,8)</sup>。

## 結果と考察

### 1) 赤血球量の分布

赤血球の細胞齢 (物理的な赤血球齢) が高いと、その密度が増加するが<sup>9)</sup>、Se (-) 食群では、高密度画分 (画分 1) のヘモグロビン含量、即ち赤血球量が有意に低下し、低密度画分 (画分 3) の赤血球量が有意に多くなった (Table 1)。これは Se (-) 食群においては、赤血球が溶血しやすいために<sup>10)</sup>、若齢赤血球の比率が多くなったものと推定できる。

### 2) 各種抗酸化酵素活性の変動

Se (-) 食群では、赤血球 GSHPx の比活性が著しく低下し (Fig. 1)、赤血球細胞の抗酸化力が低下しているおそれのあることを示した。Se (-) 食群において、SOD の比活性は、赤血球齢の増加に伴って有意に低下したが、Se (+) 食群では有意な変化は認められなかった。密度の違いに基づく分画を行なう前の全赤血球画分について比べても有意差はなかった (Table 2)。カタラーゼ活性についても赤血球齢による変化は認められなかった。画分 1 について比較すると、Se (-) 食群で有意に低下したが、

**Table 1.** Hemoglobin distribution among the erythrocytes fractionated by density (%)<sup>1</sup>

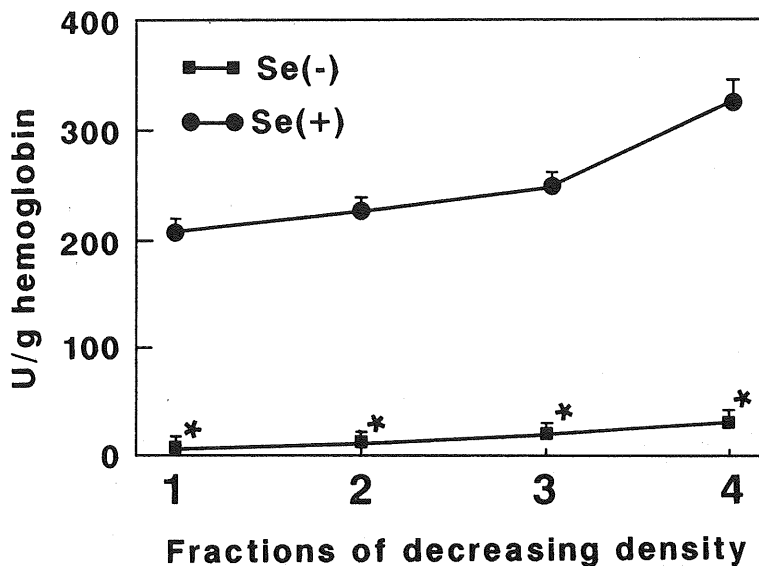
Fractions of decreasing density	Se(-)	Se(+)
F - 1	21.4 ± 2.50	49.1 ± 6.61* <sup>2</sup>
F - 2	17.0 ± 1.29	16.7 ± 1.16
F - 3	37.4 ± 6.15	19.1 ± 4.86*
F - 4	24.3 ± 9.66	15.1 ± 3.14

1. Erythrocytes were fractionated, and lysates prepared as described in "Experimentals."

2. Values are reported as means ± SEM of 9 for Se(-) group; and 6 for Se(+) group.

\* significantly different at  $p < 0.05$  from the corresponding fraction from the Se(-) group.

### Glutathione peroxidase activities



**Fig. 1.** Changes in glutathione peroxidase activity in the erythrocytes from mice fed Se-deficient (squares) and Se-adequate diets (circles). The erythrocytes were fractionated by density gradient centrifugation as described in "Experimentals." The values represented mean ± SEM (n = 7 for Se(-) group; and n = 5 for Se(+) group). Asterisk indicates significant difference at  $p < 0.05$  from the corresponding fraction from Se(+) group.

**Table 2.** Activities of superoxide dismutase and catalase in the erythrocytes fractionated by density (U/mg hemoglobin) <sup>1</sup>

Fractions of decreasing density	superoxide dismutase		catalase	
	Se (-)	Se (+)	Se (-)	Se (+)
F - 1	6.80 ± 0.478 <sup>a 2</sup>	7.53 ± 0.376	265.3 ± 49.39	419.4 ± 41.34*
F - 2	7.54 ± 0.388 <sup>ab</sup>	7.78 ± 0.656	375.8 ± 86.46	504.8 ± 50.49
F - 3	9.39 ± 0.369 <sup>bc</sup>	8.58 ± 0.323	439.9 ± 74.42	538.8 ± 53.09
F - 4	9.04 ± 0.406 <sup>c</sup>	9.25 ± 1.227	387.8 ± 83.75	635.0 ± 118.51
Whole	8.07 ± 0.334	7.93 ± 0.286	372.3 ± 57.51	499.0 ± 24.46

1. Erythrocytes were fractionated, and lysates prepared as described in "Experiments."

2. Values are reported as means ± SEM of 9 for Se (-) group; and 7 for Se (+) group. Means in a column not sharing the same superscript letter are significantly different at  $p < 0.05$ .

\* Significantly different at  $p < 0.05$  from the corresponding fraction from Se (+) group.

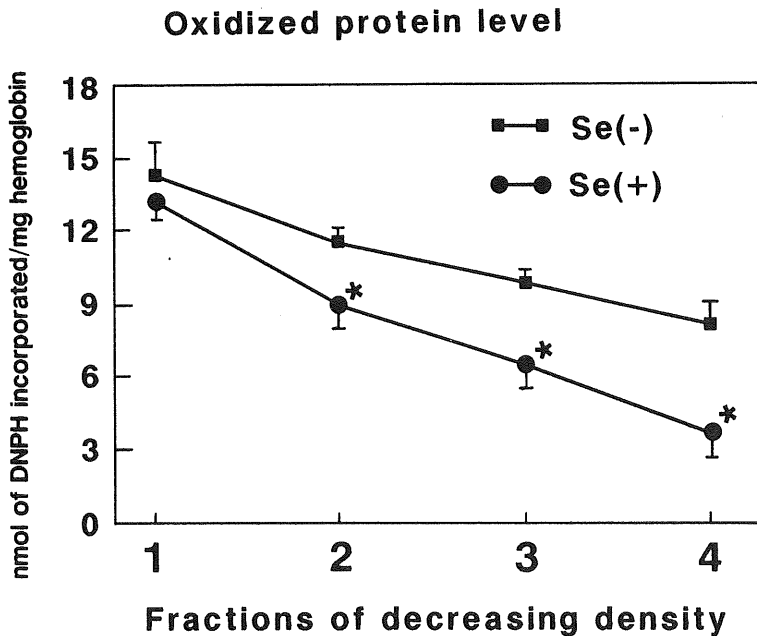
ほかの画分間では有意差はなかった (Table 2)。

以上の結果から, Se (-) 食群マウスでは GSHPx 活性が有意に低下した。SOD やカタラーゼ活性には大きな違いがなかったが, Se (-) 食群マウスは Se (+) 食群マウスよりも酸化的障害を受けやすいと考える。

### 3) 酸化タンパク質レベルの変動

酸化タンパク質は生体でできた活性酸素, 例えば, ヒドロキシルラジカルなどが, 酵素や他のタンパク質を酸化してできたものである。同密度の赤血球画分間で比較すると, 画分 1 を除いて, Se (-) 食群の酸化タンパク質含量が有意に高かった (Fig. 2)。つまり, 物理的細胞齢が同じであっても, Se (-) 食群マウス赤血球の方がより多く酸化的障害を受けていることが判明した。

GSHPx の比活性は Se (-) 食群では, Se (+) 食群に比べて, 10分の1程度に低下していた。SOD やカタラーゼの比活性は Se (-) 食群と Se (+) 食群の間に有意な違いを認めることができなかった。このことから, Se (-) 食群マウス赤血球細胞内の抗酸化力が低下し, その結果酸化タンパク質含量が多くなったものと考えられる。また赤血球細胞の抗酸化力が低下されることにより, 高齢赤血球が溶血しやすくなり, その結果循環血中に若齢赤血球の占める割合が増加するものと考えられる。本研究の結果は赤血球細胞の加齢が細胞内の酸化的障害と密接に関係していること, さらに低 Se あるいは Se 欠乏状態は, 赤血球細胞の老化を促進するという考え方を支持するものである。



**Fig. 2.** Changes in oxidized protein levels in the erythrocytes from mice fed Se-deficient (squares) and Se-adequate diets (circles). The erythrocytes were fractionated by density gradient centrifugation as described in "Experimentals." The values represented mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$  for Se(-) group; and  $n = 5$  for Se(+) group). Asterisk indicates significant difference at  $p < 0.05$  from the corresponding fraction from Se(+) group.

### 文 献

1. 何普明, 安本教傳 (1990) 日本栄養・食糧学会誌 43:121
2. BEUTLER, E., C. WEST and K.-G. BLUME (1962) J. Lab. Clin. Med. 88:328
3. VOTTORE, L., M. C. DEMATTEIS and P. ZAMPINI (1980) Am. J. Hematol. 8:291
4. PAGLIA, D. E. and W. N. VALENTINE (1967) J. Lab. Clin. Med. 70:158
5. McCORD, J. M. and I. FRIDOVICH (1969) J. Biol. Chem. 244:6049
6. AEBI, H. (1984) Methods in Enzymol. 105:121
7. STARKE, P. E., C. N. OLIVER and E. R. STADTMAN (1987) FASEB J. 1:36
8. AHN, B., S. G. RHEE and E. R. STADTMAN (1987) Anal. Biochem. 161:245
9. BORUN, E. R., W. G. FIGUEROA and S. M. PERRY (1957) J. Clin. Invest. 36:676
10. KIM, C., K. YASUMOTO, T. SUZUKI and M. YOSHIDA (1988) Nutr. Res. 8:757